



**Universidad
Zaragoza**



CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS SINTÉTICAS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO EN FLUJO POR CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO (AF4) CON DETECTOR DE DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

TRABAJO FIN DE GRADO

Marta Santonja García

Director: Eduardo Bolea Morales

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS)

Septiembre 2019

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Fraccionamiento en flujo por campo (FFF)</i>	1
1.2 <i>Fraccionamiento en flujo por campo de flujo (FIFFF).....</i>	1
1.2.1 Flujo asimétrico (AF4)	3
1.2.1.1 Señal obtenida en AF4	4
1.2.2 Detector UV-VIS	4
1.2.3 Detector DLS	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. EXPERIMENTAL.....	7
3.1 <i>Instrumentación y reactivos</i>	7
3.1.1 Instrumentación.....	7
3.1.2 Aparatos.....	7
3.1.3 Reactivos, estándares y muestras.	7
3.1.4 Materiales	8
3.2 <i>Procedimientos.....</i>	8
3.2.1 Preparación de las fases móviles.....	8
3.2.2 Preparación de las suspensiones de nanopartículas	8
3.2.2.1 Preparación de la muestra cosmética.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1 <i>Estudio del efecto del tamaño de las nanopartículas sobre la estimación del tamaño mediante AF4 – DLS.....</i>	9
4.2 <i>Estudio del efecto de la concentración de las nanopartículas sobre la estimación del tamaño mediante AF4 – DLS.....</i>	11
4.3 <i>Estudio de los parámetros instrumentales óptimos para el estudio de condiciones limite</i>	14
4.3.1 Estudio de las condiciones instrumentales del detector DLS	14
4.3.1.1 Atenuación y posición del foco	14
4.3.1.2 Tiempo de adquisición	15
4.3.2 Estudio de las condiciones instrumentales de la técnica AF4	16
4.3.2.1 Estudio de la influencia del caudal de salida Flow Rate	16
4.3.2.2 Estudio de la influencia del caudal Cross Flow.....	17
4.4 <i>Estudio del efecto de la naturaleza de distintas nanopartículas sobre la estimación de tamaño mediante AF4-DLS</i>	20
4.4.1 Nanopartículas de Au	20
4.4.2 Nanopartículas de Poliestireno	21
4.5 <i>Aplicación de AF4-DLS sobre la caracterización de nanopartículas de poliestireno en muestras cosméticas.....</i>	22
5. CONCLUSIONES	23

6. BIBLIOGRAFÍA.....	24
7. ANEXOS.....	26

RESUMEN

En el presente trabajo se han estudiado las condiciones límites que permiten la caracterización del tamaño de nanopartículas sintéticas mediante el acoplamiento de la técnica de fraccionamiento en flujo por campo de flujo asimétrico (AF4 Asymmetric flow field - flow fractionation) y un detector basado en dispersión de luz dinámica (DLS Dynamic Light Scattering). Estas condiciones incluyen el límite inferior de tamaño, la concentración y algunos parámetros instrumentales que afectan a la estimación del tamaño mediante AF4-DLS.

AF4 permite la separación de nanopartículas tanto naturales como sintéticas en función de sus coeficientes de difusión. Esta técnica puede acoplarse a distintos tipos de detectores en línea, obteniéndose información adicional sobre las especies eluidas. En el caso del detector DLS, éste permite la determinación de su diámetro hidrodinámico a partir de la medida de la luz dispersada. Estas medidas exigen en cambio, una adaptación de las condiciones instrumentales en el caso de señales transitorias para la obtención de resultados fiables, al no realizarse calibración.

Así, se han estudiado los límites de tamaño y concentración con distintas suspensiones de estándares de tamaño de nanopartículas de plata, así como el efecto del caudal y flujo cruzado aplicado en AF4, y el tiempo de adquisición en el detector DLS sobre los límites obtenidos. En términos generales, mayores tiempos de residencia en la celda del detector mejoran los resultados, con un límite inferior de tamaño de 40 nm para unas concentraciones del orden de 20 mg/L. Posteriormente, se ha ampliado el estudio con nanopartículas de distinta naturaleza y las condiciones estudiadas se han aplicado a la caracterización de nanopartículas sintéticas presentes en una muestra cosmética.

ABSTRACT

In the present work we have studied the limit conditions that allow the characterization of the size of synthetic nanoparticles by coupling the Asymmetric flow field flow fractionation (AF4) and a detector based on dynamic light scattering (DLS). These conditions include the lower size limit, concentration and some instrumental parameters that affect the AF4-DLS size estimation.

AF4 allows the separation of both natural and synthetic nanoparticles according to their diffusion coefficients. This technique can be coupled to different types of detectors online, obtaining additional information on eluted species. In the case of the DLS detector, it allows the determination of its hydrodynamic diameter by the measurement of scattered light. These measures require an adaptation of the instrumental conditions in the case of transient signals in order to obtain reliable results, as calibration is not carried out.

Thus, size and concentration limits have been studied with different suspensions of standard size of silver nanoparticles, as well as the effect of the flow and cross flow applied in AF4, and the acquisition time in the DLS detector on the obtained limits. In overall terms, longer residence times in the detector cell improve the results, with a lower size limit of 50 nm for concentrations in the order of 20 mg/L. Subsequently, the study was extended with nanoparticles of different nature and the conditions studied were applied to the characterization of synthetic nanoparticles present in a cosmetic sample.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fraccionamiento en flujo por campo (FFF)

El importante desarrollo del campo de la Nanotecnología y las Nanopartículas (NPs, 1-100 nm), supone la necesidad de métodos precisos y con alta resolución para la separación y caracterización de las nanopartículas. La técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo (FFF) es uno de los métodos más usados actualmente, tanto para nanopartículas naturales como sintéticas ¹.

En esta técnica de separación se aplica una fuerza (campo o gradiente) de forma perpendicular a un canal en el cual circula un portador en régimen laminar ².

Debido a la estructura del canal, se forma un flujo parabólico (figura 1), por lo que la elución de las nanopartículas tiene lugar en orden creciente a su difusión y, por tanto, del tamaño respecto al tiempo. Si se modifica la velocidad del flujo perpendicular al canal, el tiempo de retención de la muestra varía haciendo así más eficaz la separación ³.

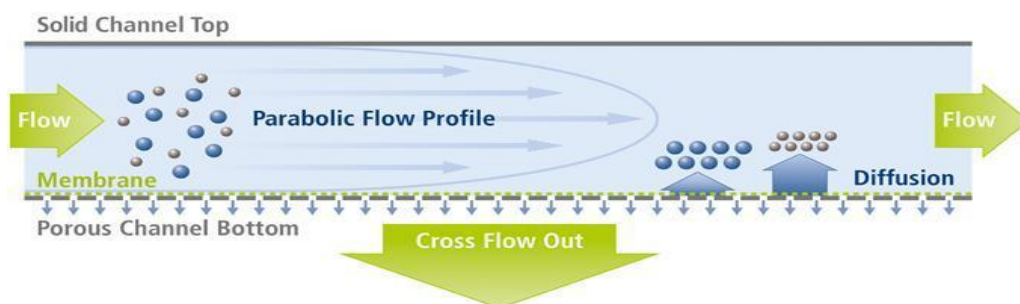


Figura 1. Esquema del proceso de separación en FFF.

Se pueden emplear diversos campos o gradientes tales como Térmico (ThFFF), Eléctrico (EFFF), de Sedimentación (SdFFF) o de Flujo (FIFFF), en función de los rangos de tamaños o el tipo de aplicación con el que se trabaje.

El FIFFF se divide a su vez en Flujo simétrico (FIFFF), Flujo asimétrico (AF4) y Hollow fiber (H5F) ⁴, siendo el AF4 el más usado en la actualidad, y es en el que se centra este trabajo.

1.2 Fraccionamiento en flujo por campo de flujo (FIFFF)

El FIFFF es una de las técnicas más usadas actualmente para partículas naturales y sintéticas, esto es debido a su rango de aplicación que puede ir desde 1 nm a 50 μm , y a la rápida concentración de la muestra en el canal ¹.

El canal está formado por dos bloques de metacrilato separados por un espaciador (spacer). El spacer puede tener distinta geometría, esta es una de las diferencias entre FIFFF y AF4 ¹.

En el fondo del canal hay una membrana de permeación que permite el paso del Cross Flow, pero, a su vez, retiene las partículas que se desean separar. El tamaño de poro de esta membrana establece el límite inferior de tamaño con el que se puede trabajar, estando comprendido entre 1 y 10 kDa. En este trabajo se utiliza una membrana de 5kDa de polietersulfona (PES) ⁵.

En FIFFF el volumen/tiempo de retención de las partículas está relacionado con el coeficiente de difusión y la velocidad del flujo perpendicular (o flujo cruzado, Cross Flow), V_c , mediante la siguiente ecuación:

$$D = \frac{\lambda V_c w^2}{V^0} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde V^0 es el volumen muerto del canal, w la anchura del mismo y λ es el parámetro de retención, que puede calcularse a partir de la siguiente expresión simplificada para altos niveles de retención:

$$R = \frac{V^0}{V_r} = 6\lambda \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde V_r es el volumen de retención y R se llama coeficiente de retención.

La difusión de las partículas, en constante movimiento browniano, varía en función del coeficiente de difusión D , que se puede relacionar con el diámetro hidrodinámico d_h a través de la ecuación de Stokes - Einstein:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde k es la constante de Boltzmann ($1.3806 \times 10^{-23} \frac{J}{K}$), T es la temperatura y η es la viscosidad del medio (portador) ^{1,6}.

El diámetro hidrodinámico es el parámetro que se obtiene en técnicas de fraccionamiento en flujo ⁷. Representa el diámetro de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión que la nanopartícula que se desea caracterizar ⁸.

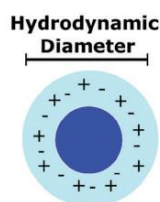


Figura 2. Representación del diámetro hidrodinámico.

Una de las características de esta técnica, además de la ausencia de fase estacionaria ^{6,9}, es la posibilidad de acoplarse en línea con múltiples detectores, tanto los utilizados habitualmente en cromatografía líquida (UV-Vis, fluorescencia, técnicas de dispersión), como a técnicas de espectrometría atómica (ICP-OES, ICP-MS), debido a la compatibilidad de la composición del portador con dichas técnicas. Alternativamente, se pueden recoger fracciones para su posterior análisis con diferentes técnicas que no permiten un acoplamiento directo (offline), como técnicas de dispersión, de microscopía electrónica (SEM, TEM), de espectrometría atómica (AAS) y microscopía de fuerza atómica (AFM) ¹⁰.

En este trabajo se utilizan de manera online el detector UV-VIS y el de dispersión de radiación dinámica (DLS).

1.2.1 Flujo asimétrico (AF4)

En AF4 la forma del canal es asimétrica. A diferencia de FIFFF, en AF4 solo la pared inferior está formada por una pieza de cerámica permeable, mientras que la superior es impermeable.

El flujo que entra al canal (Flow in) se divide en el flujo que recorre el canal (Flow out) y el flujo cruzado (Cross Flow) ¹.

$$V_{in} = V_{out} + V_c \quad (\text{Ecuación 4})$$

Por tanto, para que se mantenga uniforme el flujo perpendicular, la anchura del canal va disminuyendo como puede observarse en la siguiente figura.

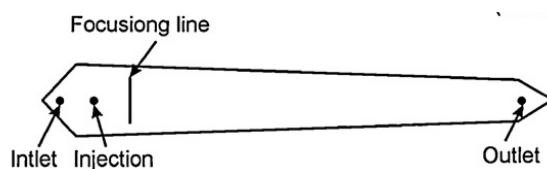


Figura 3. Esquema del canal típico de AF4.

Las etapas que tienen lugar en el proceso de fraccionamiento son:

1. Inyección: se introduce un volumen de muestra entre 10 y 100 μL a través de una válvula de inyección de 6 vías. Esto tiene lugar a través de un puerto de entrada situado ligeramente por debajo de la entrada del flujo.
2. Relajación / Focalización: se ajustan los caudales del flujo de entrada y del Focus Flow que, al ir en dirección opuesta, definirá una zona donde la muestra se acumula en el interior del canal. De esta forma, la muestra está focalizada y desde esa posición se empieza el fraccionamiento.
3. Elución: al dejar de aplicar el Focus Flow, tiene lugar la elución de las especies según su tamaño y el crossflow aplicado.

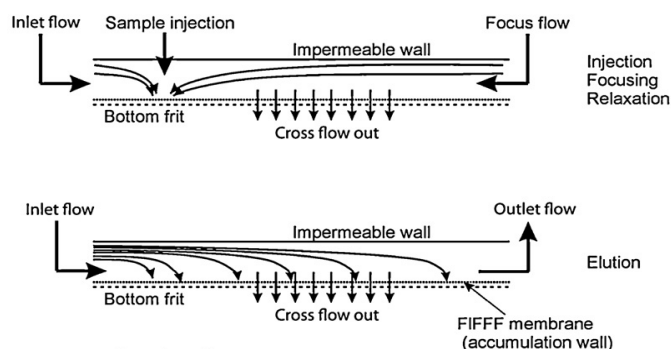


Figura 4. Esquema de las etapas de AF4.

1.2.1.1 Señal obtenida en AF4

En AF4 se obtiene una señal denominada fractograma, donde en el eje y aparece la intensidad de la señal obtenida por el detector (o detectores) y en el eje x aparece el tiempo (en minutos).

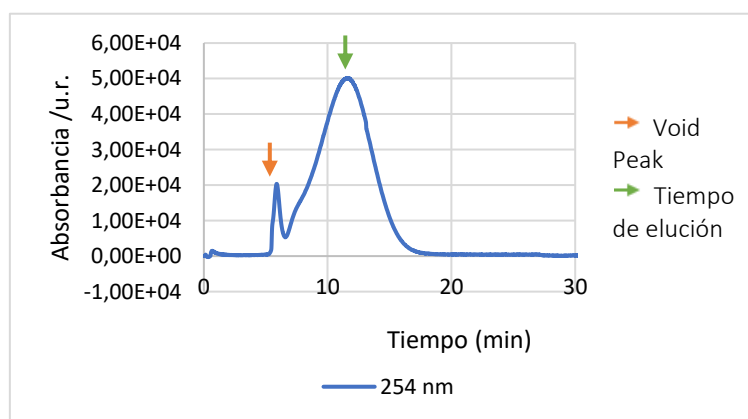


Figura 5. Ejemplo de un fractograma de AF4. Fractograma de un estándar de Poliestireno de 50 nm (100mg/L).

Al principio del fractograma aparece un pico al denominado tiempo muerto (Void Peak) que corresponde a la elución de especies que no han sido focalizadas correctamente o que no son retenidas en las condiciones de crossflow aplicadas. A continuación, aparecen las especies de interés a los distintos tiempos de retención o elución medidos en el máximo de la señal, de la misma manera que en las técnicas cromatográficas.

1.2.2 Detector UV-VIS

En el detector UV-VIS, la señal medida en el caso de las nanopartículas depende de la absorción y dispersión de radiación, dependiente a su vez del tamaño de las nanopartículas y de la longitud de onda de la luz.

En las nanopartículas metálicas ocurren fenómenos de plasmón superficial. Estos fenómenos son oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Para que esto ocurra, el tamaño de la nanopartícula tiene que ser menor que la longitud de onda de luz incidente. La resonancia de estos plasmones superficiales justifica la aparición de bandas de absorción. En el caso de metales nobles (Au, Ag) la resonancia es máxima y provoca la aparición de bandas en la región del visible¹¹.

Para obtener la mayor sensibilidad en este tipo de detectores, se utiliza la longitud de onda a la cual la absorbancia sea máxima y se evitan regiones donde absorba el portador¹.

1.2.3 Detector DLS

DLS es una técnica muy usada para la caracterización por tamaños de nanopartículas en suspensión. El detector DLS mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada debido al movimiento browniano de las partículas. Dentro del instrumento hay un componente llamado correlador, que mide el grado de similitud entre dos señales a lo largo de un período de tiempo.

Así se establece una función de correlación dependiente de la velocidad de movimiento browniano de las nanopartículas, que se relaciona con el tamaño de las partículas mediante la Ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 3)^{7,12}.

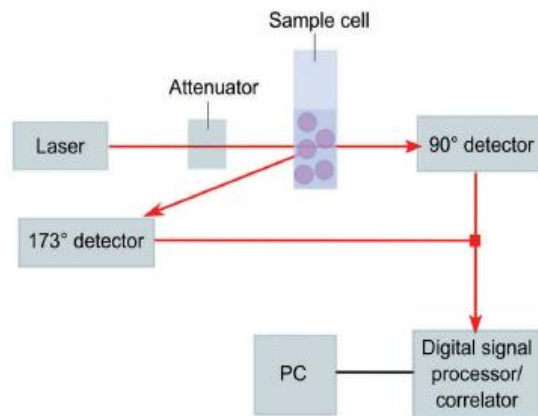


Figura 6. Esquema de una configuración típica de DLS.

Como resultado de la teoría de Rayleigh, la intensidad de la luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro, por lo tanto, los análisis están fuertemente influenciados por la presencia de las partículas de mayor tamaño, lo que provoca la sobreestimación de tamaños en suspensiones polidispersas⁷. Al acoplarse con una técnica de separación se evita la sobreestimación de tamaños, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de luz dispersada es menor puesto que la cantidad de muestra que se inyecta también lo es.

Los diámetros hidrodinámicos obtenidos en DLS suelen ser mayores que los tamaños geométricos correspondientes. Esta diferencia se debe principalmente al hecho de que las nanopartículas no son esferas rígidas perfectas¹³.

Otras desventajas del uso de DLS son sus limitaciones en cuanto a diámetro y concentración.

En cuanto al diámetro de las nanopartículas, DLS es capaz de trabajar teóricamente dentro del rango de 0,3nm hasta 10 μm . Para partículas con diámetros entre 10 y 100 nm (NPs), se recomienda trabajar con concentraciones de muestras mínimas de 100 mg/L y máximas de un 5% en masa ($d=1\text{g/cm}^3$).

Aunque el tamaño de las nanopartículas podría ser estimado solo con AF4 gracias al tiempo de retención y conociendo los valores de los flujos (Ecuaciones 1-3), desde un punto de vista práctico, es más rápido y directo el uso de DLS acoplado como detector en línea a AF4¹⁴. Además, el uso de un detector que ofrezca una medición independiente y complementaria del tamaño de las nanopartículas asegura el comportamiento del fraccionamiento dentro del canal de AF4¹ y mejora la resolución en muestras complejas¹⁵.

Sin embargo, estas medidas exigen una adaptación de las condiciones instrumentales en el caso de señales transitorias para la obtención de resultados fiables puesto que no se realiza calibración.

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se planteó como objetivo estudiar la capacidad de la técnica de fraccionamiento AF4 acoplada con un detector de dispersión de radiación DLS para la caracterización por tamaño de nanopartículas sintéticas. Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos parciales:

1. Conocer los fundamentos de ambas técnicas, y las limitaciones al acoplarse, en términos de tamaño de partícula y concentración que pueden estimarse de forma correcta mediante el uso de estándares de nanopartículas de plata de tamaño conocido.
2. Estudiar las variables experimentales que más pueden influir en la determinación del tamaño de las nanopartículas en las condiciones más limitantes (rango inferior de tamaño).
3. Ampliar el estudio a distintos tipos de nanopartículas (oro y poliestireno), así como a la determinación del tamaño de nanopartículas sintéticas en una muestra cosmética.

Respecto a los objetivos académicos, el más importante sería aprender a realizar un trabajo original en el que demostrar los conocimientos aprendidos durante la carrera, lo que implica conocer nuevas técnicas instrumentales como el AF4 y DLS, realizar una memoria científica y exponer y debatir ante un tribunal el trabajo desarrollado.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación y reactivos

3.1.1 Instrumentación

- Equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de flujo Asimétrico (AsFIFFF) (Postnova Analytics, Landsberg, Germany)).
 - Canal 27,5 cm (largo) x 2 cm (ancho).
 - Membrana 5kDa de polietersulfona (PES).
- Espectrómetro Molecular UV-Vis Diode Array (Shimadzu, Duisburg, Germany).
 - λ : 190 a 800 nm.
- Equipo Zetasizer Nano Dynamic Light Scattering (DLS).
 - Modo Discontinuo: condiciones óptimas atenuación y posición elegidas por el equipo.
 - Modo Continuo (acoplado a AF4): condiciones fijas para la obtención de la máxima intensidad.
- Balanza Analítica GH- 200 (AND, California, USA).

3.1.2 Aparatos

- Micropipeta RAININ SL-1000 (100-1000 μ L).
- Micropipeta 1-5 mL.
- Micropipeta BIOHIT PROLINE (5-50 μ L).
- Equipo de filtración.
- Baño ultrasonidos Ultrasons-P (Selecta, Barcelona, España).
- Bomba peristáltica.

3.1.3 Reactivos, estándares y muestras.

- Agua ultrapura (Milipore).
- Azida de Sodio (NaN_3) 1g/L (PanReac, Barcelona, España).
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (Bio-rad, Hercules, EE. UU.).
- Hidróxido de potasio (KOH) (PanReac, Barcelona, España).
- NovaChem Surfactant (Postnova Analytics).
- Disoluciones estándares de Nanopartículas Plata (Ag)
 - 10 nm, 20 nm, 40 nm, 60 nm (20 mg/L), Silver Nanospheres, citrate (Nanoxact Nanocomposix San Diego, EE. UU.).
 - 50 nm (5000 mg/L), Silver Nanospheres, polivinilpirrolidona (PVP) (Nanoxact Nanocomposix San Diego, EE. UU.).
- Disoluciones estándares de Nanopartículas Oro (Au)
 - 20 nm 100 mg/L, Gold Nanospheres, citrate (Nanoxact Nanocomposix San Diego, EE. UU.).

- 50 nm 50 mg/L, Gold Nanospheres, citrate (Nanoxact Nanocomposix San Diego, EE. UU.).
- Disoluciones estándares de Nanopartículas Poliestireno
 - Poliestireno 50 nm, 2.5 % w/w (Fluka).
 - Poliestireno 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 2 % w/w (Fluka).
- Muestra cosmética exfoliante con microesferas de polietileno: Hyfac Gommage Scrub (Laboratoires Moulin Royal Cosmetics, Saint Claire, Francia).

3.1.4 Materiales

- Tubos tipo Falcon de polipropileno 50 mL.
- Jeringuillas de 2 mL.
- Micro jeringuillas de 500 μ L.
- Frascos para el portador.
- Filtros de membrana de nylon (poro 0.20 μ m).
- Cubeta para las medidas en DLS
 - Célula de flujo de cuarzo.

3.2 Procedimientos

3.2.1 Preparación de las fases móviles

En este trabajo se usan dos fases móviles o portadores, que se diferencian en el tipo de tensoactivo adicionado: una con un tensoactivo aniónico, Dodecilsulfato Sódico (SDS) y otra con un tensoactivo mixto, que contiene una mezcla de diversos tensoactivos, comercializado bajo el nombre de Novachem Surfactant.

El portador de SDS al 0.01% (m/v) se prepara añadiendo 10 ml de SDS sobre un litro de agua ultrapura y añadiendo 150 μ L de KOH para obtener un pH = 8.

El portador de Novachem Surfactant al 0.05 % (m/v) se prepara añadiendo 500 μ L del reactivo puro sobre un litro de agua ultrapura, generando un pH entre 8 y 9.

Una vez se tiene las fases móviles, se procede al purgado de las bombas del AF4 y posteriormente al acondicionamiento del canal para la homogeneización de la membrana del canal.

3.2.2 Preparación de las suspensiones de nanopartículas

Se preparan suspensiones de los distintos estándares de nanopartículas de la siguiente forma.

Primero se sonicán las suspensiones comerciales de los estándares durante 2 minutos en un baño de ultrasonidos.

Después se introduce en un tubo falcon de 50 ml la cantidad necesaria (en volumen) para obtener la concentración requerida y se diluye con el portador para que el volumen final sea de 5 ml.

3.2.2.1 Preparación de la muestra cosmética

Para la preparación de la muestra cosmética se establece una relación de 100 mg de muestra/L en agua, añadiendo la cantidad necesaria de muestra en un tubo falcon de 50 ml y añadiendo la cantidad de agua necesaria para obtener la concentración requerida. A continuación, se procede a la filtración de la suspensión, sonicando la misma durante un minuto y filtrando un volumen de 10 ml a vacío con un filtro de 1 micra de teflón, recogiendo el filtrado en un bote de vidrio.

Por último, antes de realizar las medidas, se sonicará la muestra filtrada durante 2 minutos en el baño de ultrasonidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio del efecto del tamaño de las nanopartículas sobre la estimación del tamaño mediante AF4 – DLS

Dado que los límites inferiores con los que permite trabajar DLS están en el rango de los nanómetros, se comenzó el estudio de las condiciones de trabajo de AF4-DLS con estándares de nanopartículas de plata de diferentes tamaños en un rango comprendido entre 10 y 100 nm, con los que se tenía experiencia previa. Las condiciones de medida fueron:

- Caudal: 1ml/min.
- Flujo cruzado: 0.325 ml/min.
- Tiempo de adquisición en DLS: 3s.
- Composición del portador: SDS al 0.01% (m/v).

Se realizaron dos réplicas para cada estándar, todos ellos a una concentración de 20 mg/L, a pesar de que en DLS se recomiendan concentraciones mínimas de 100 mg/L, puesto que las suspensiones de partida de las nanopartículas son de esa concentración.

La figura 7 muestra los fractogramas obtenidos para los estándares de 20 y 60 nm, tanto con el detector de absorción UV-Vis como el DLS (señal de intensidad de la radiación dispersada y diámetro hidrodinámico estimado para cada intervalo de medida). Se observa coincidencia entre ambas señales (absorción y dispersión) en los tiempos de elución, así como un aumento en los diámetros al aumentar los tiempos de retención, aunque los diámetros estimados en regiones de baja intensidad carecen en general de validez. Destacar que la señal de intensidad dispersada para las nanopartículas de 20 nm es muy inferior a la de 60 nm, debido a la dependencia con el diámetro a la sexta potencia.

Además, se realizó el estudio de las nanopartículas de 20, 50 y 100 nm en DLS sin acoplar a AF4 (en discontinuo) con el objetivo de establecer las diferencias, siendo los resultados obtenidos los que se presentan en la tabla 1.

	<i>Diámetro obtenido (nm) AF4 -DLS</i>	<i>Error relativo % respecto al diámetro nominal</i>	<i>Diámetro obtenido (nm) DLS (hidrodinámico)</i>	<i>Error relativo % respecto diámetro hidrodinámico</i>
<i>Ag 10 nm (20mg/l)</i>	63 ± 5.9	+530 ± 59	-	
<i>Ag 20 nm (20mg/l)</i>	68 ± 4.1	+240 ± 21	31 ± 6.1	+119 ± 28
<i>Ag 40 nm (20mg/l)</i>	48 ± 1.2	+20 ± 3	-	
<i>Ag 50 nm (20mg/l)</i>	78 ± 1.3	+56 ± 2.6	73 ± 0.88	+6.8 ± 3.1
<i>Ag 60 nm (20mg/l)</i>	54 ± 1.6	-10 ± 2.6	-	
<i>Ag 100 nm (20mg/l)</i>	77 ± 2.3	-23 ± 2.3	104 ± 0.62	-26 ± 2.4

Tabla 1. Resultados de los diámetros obtenidos y errores calculados para las nanopartículas de Ag representados como: valor medio ± desviación estándar (N=10), excepto diámetro hidrodinámico (N=3). En todos los estudios de este trabajo, para el cálculo del valor medio se cogen 10 valores en torno al máximo de intensidad de la medida que se está llevando a cabo. – no medido.

Para las nanopartículas de menor tamaño, (10 y 20 nm), los resultados obtenidos no son correctos, ya que los diámetros difieren mucho respecto del valor nominal. El estudio de las nanopartículas de 20 nm en DLS tampoco proporciona buenos resultados, la señal de intensidad es baja y los diámetros hidrodinámicos difieren también del valor nominal. Por tanto, aunque mediante AF4-DLS los resultados son peores, el DLS no es capaz de medir a esos tamaños.

Las nanopartículas de 50 nm se encuentran recubiertas por PVP, lo que podría conllevar un aumento del diámetro hidrodinámico de las mismas. Este hecho se corrobora al medir estas nanopartículas en DLS ya que se obtiene un resultado más acorde al obtenido mediante AF4-DLS. Por tanto, la estimación del tamaño obtenida en AF4-DLS es correcta para estas nanopartículas.

En las nanopartículas de 100 nm se observa que los diámetros obtenidos en AF4-DLS son inferiores al diámetro nominal, mientras que el diámetro hidrodinámico obtenido en DLS sí que se corresponde al diámetro nominal. Esto se podría considerar un comportamiento anómalo ya que, como se verá en el apartado 4.4.2, para las nanopartículas de poliestireno se obtienen resultados coherentes con tamaños de hasta 500nm.

Finalmente, se puede concluir que el límite de tamaño inferior con el que se pueden obtener resultados aceptables, con errores del orden de 20 %, en AF4-DLS son por encima de los 40nm, utilizando las condiciones estándares de medida del detector DLS y las óptimas para la separación de estas nanopartículas en AF4.

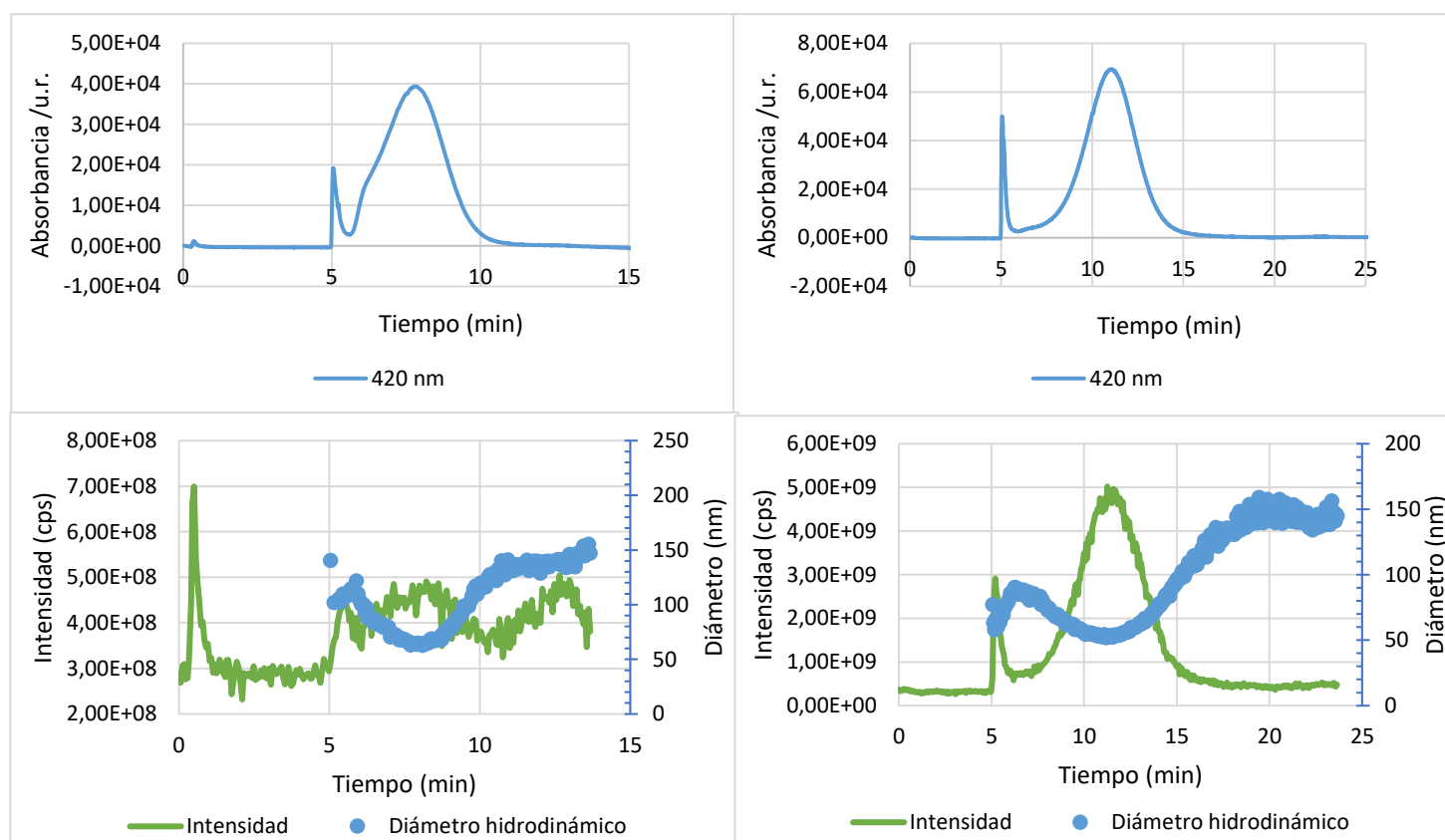


Figura 7 (a, b, c y d). Fractogramas (a y b) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (c y d) de los estándares de nanopartículas de Ag de 20 nm (a y c) y de 60 nm (b y d).

Los fractogramas y representaciones de intensidad y diámetro hidrodinámico frente al tiempo para los estándares de nanopartículas de 10, 50 y 100 nm se encuentran en los Anexos en el apartado 7.1.

4.2 Estudio del efecto de la concentración de las nanopartículas sobre la estimación del tamaño mediante AF4 – DLS

Se desean conocer las limitaciones en cuanto a concentración de las muestras de esta técnica. Para ello, se realizaron medidas de los estándares de nanopartículas de plata de 50 nanómetros a distintas concentraciones. Las condiciones de medida fueron:

- Caudal: 1ml/min.
- Flujo cruzado: 0.325 ml/min.
- Tiempo de adquisición en DLS: 3s.
- Composición del portador: SDS al 0.01% (m/v).

	<i>Diámetro obtenido (nm) AF4 -DLS</i>	<i>Error relativo % respecto al diámetro nominal</i>	<i>Error relativo % respecto diámetro hidrodinámico</i>
<i>Ag 50 nm (5mg/l)</i>	84 ± 1.5	+68 ± 3	+15 ± 3.5
<i>Ag 50 nm (20mg/l)</i>	78 ± 1.3	+56 ± 2.6	+6.8 ± 3.1

Tabla 2. Resultados de los diámetros obtenidos y errores calculados para las nanopartículas de Ag representados como: valor medio ± desviación estándar (N=10), excepto diámetro hidrodinámico (N=3).

Como puede verse en la tabla 2, los diámetros obtenidos se alejan del diámetro nominal. Si se comparan estos diámetros con el diámetro hidrodinámico obtenido en DLS para las nanopartículas de 50 nm, 73 ± 0.88 nm (Tabla 1), se observa que los diámetros no difieren demasiado. Se comprueba mediante test t si los resultados para 20 mg/L difieren del diámetro hidrodinámico. Se obtiene que el valor crítico de t (dos colas) es menor que el valor estadístico t por lo que los resultados si son significativamente diferentes, a pesar de esto, se asume que un error del 6.8 % es aceptable.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	78.3629432	73.2966667
Varianza	1.78558828	0.77013333
Observaciones	10	3
Varianza agrupada	1.6009601	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	6.08257661	
P(T<=t) una cola	3.9658E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.79588482	
P(T<=t) dos colas	7.9317E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20098516	

Tabla 3. Test t comparando estándar NPs Ag 50 nm (20 mg/L) en AF4-DLS y en DLS.

Para la concentración de 5mg/L el diámetro que se obtiene es algo superior, se comprueba mediante un Test t si los resultados difieren de los obtenidos a 20 mg/L. Se obtiene que el valor crítico de t (dos colas) es menor que el valor estadístico t por lo que los resultados si son significativamente diferentes.

Por otro lado, el error respecto al diámetro hidrodinámico es del 15 % y podría ser asumible, aunque evidentemente, trabajar en estas condiciones de concentración provoca un aumento del error de la estimación.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	Variable 1	Variable 2
Media	84.0492614	78.3629432
Varianza	2.35382504	1.78558828
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	2.06970666	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	8.83815803	
P(T<=t) una cola	2.8827E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1.73406361	
P(T<=t) dos colas	5.7655E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2.10092204	

Tabla 4. Test t comparando estándar NPs Ag 50 nm (20 mg/L) y estándar Ag 50 nm (5 mg/L) en AF4-DLS.

Por tanto, para asegurar que los resultados obtenidos son los más fiables, se va a trabajar con la concentración de 20 mg/L para los siguientes estudios.

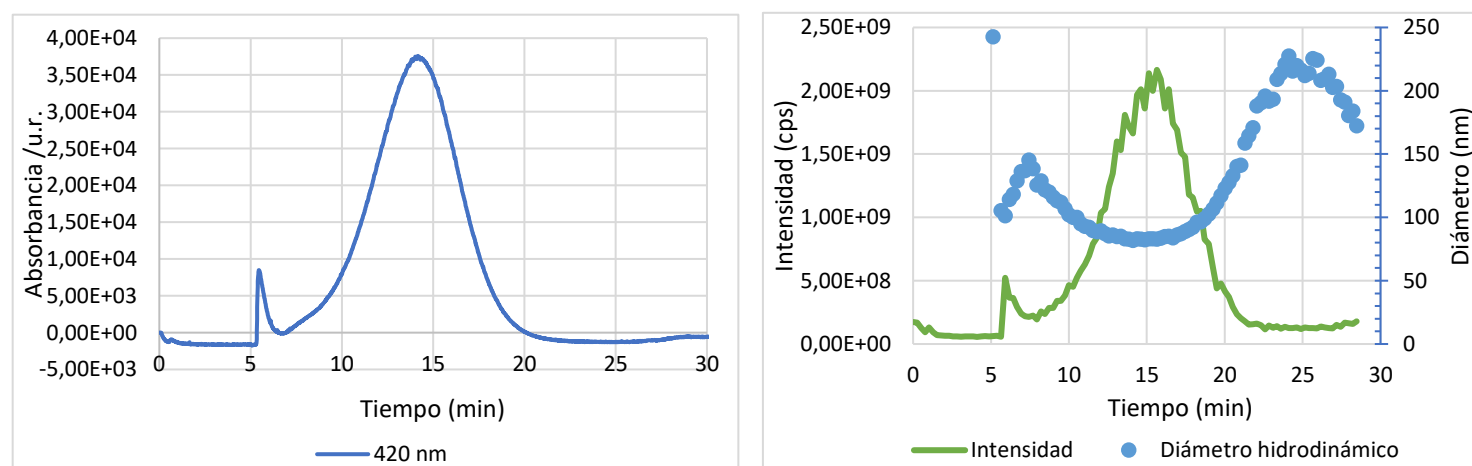


Figura 8 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para el estándar de nanopartículas de Ag de 50 nm (5mg/L).

4.3 Estudio de los parámetros instrumentales óptimos para el estudio de condiciones limite

Tras los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del tamaño de las nanopartículas, se concluye que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por AF4-DLS y los obtenidos por DLS para suspensiones que dispersan menos radiación (tamaños inferiores a 40 nm). Debido a que las medidas en AF4-DLS son transitorias, se van a estudiar las variables que pueden afectar al tiempo de adquisición y a los tiempos de estancia en la celda de medida.

En AF4, el tiempo de retención puede relacionarse con otros parámetros a través de la siguiente ecuación ¹⁶:

$$t_r = \frac{w^2}{6D} \ln \left(1 + \frac{V_c}{V_{out}} \right) \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde w es el espesor del spacer, D el coeficiente de difusión del analito, V_c el caudal del Cross Flow, y V_{out} el caudal del Flow Rate. De acuerdo con esta ecuación, una disminución del caudal V_{out} o un aumento de V_c , provocan un aumento del tiempo de retención, lo que lleva asociado un aumento de la anchura de los picos tal y como se observa en la ecuación 6 ¹⁶:

$$\sigma = 0.82 \frac{A_w}{V_c} \sqrt{\ln \left(1 + \frac{V_c}{V_{out}} \right)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

siendo σ la anchura del pico en la base. El aumento de la anchura de los picos conlleva un aumento del tiempo de estancia en la celda de medida. Estos factores se van a estudiar en la determinación del diámetro hidrodinámico mediante AF4-DLS.

4.3.1 Estudio de las condiciones instrumentales del detector DLS

4.3.1.1 Atenuación y posición del foco

Hay tres parámetros a tener en cuenta en el detector DLS, la atenuación, la posición del foco dentro de la cubeta y el tiempo de adquisición (se verá a continuación)⁶.

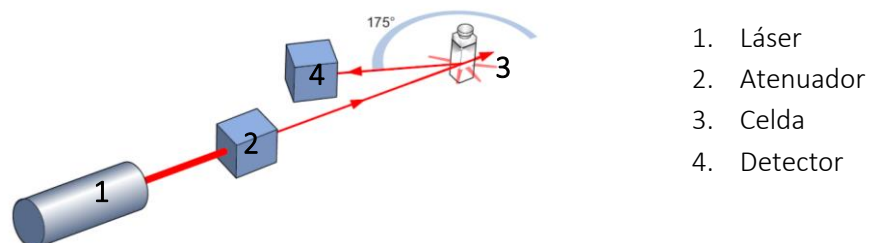


Figura 9. Esquema de un detector DLS con posición de 175°

Al incidir la fuente láser en la muestra, parte de la luz es dispersada. La intensidad de esta luz debe estar dentro de un rango específico y para eso se usa un atenuador del haz incidente.

Por otro lado, la lente móvil permite modificar la posición del foco dentro de la cubeta, pudiendo medir un rango más amplio de concentraciones de la muestra. Tanto la atenuación como la posición óptima del foco la determina automáticamente el software del equipo durante la medida.

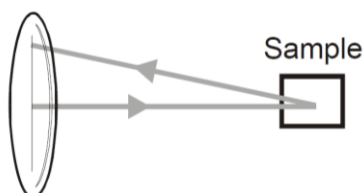


Figura 10. Ejemplo de la posición del foco dentro de la cubeta.

Estos parámetros solo se pueden modificar cuando se trabaja en discontinuo, si se trabaja en continuo con una célula de flujo, como en el caso de acoplarse a AF4, los parámetros tienen que estar fijos.

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se establecen unos valores fijos que se consideran óptimos para las medidas y que proporcionan la mayor sensibilidad (mínima atenuación y la posición del foco ajustada en el centro de la celda).

4.3.1.2 Tiempo de adquisición

Para el estudio de las condiciones óptimas se eligen las nanopartículas de Ag de 20 nm ya que se estimaban de forma aproximada por DLS, pero no por AF4-DLS. Así, se comprobará si se pueden mejorar los resultados obtenidos en medidas en continuo, modificando el tiempo de adquisición de la función de correlación con la que se obtiene el diámetro hidrodinámico.

Se ha de tener en cuenta que en medidas en discontinuo este tiempo puede alargarse de forma indefinida, mejorando el ajuste de la función de correlación. En medidas transitorias en continuo, un aumento del tiempo de adquisición disminuye el número de medidas correspondientes a las especies eluidas y, por tanto, tiene lugar una posible pérdida de información.

Se consideró un aumento en el tiempo de adquisición en DLS de 3 s a 15 s. Teniendo en cuenta que los picos se eluyen en aproximadamente 4 min (240 s), y que la parte central de mayor intensidad se produce en aproximadamente 120 s (ver figura 11), se dispone todavía de 8-10 medidas de diámetro para un pico midiendo a 15 s.

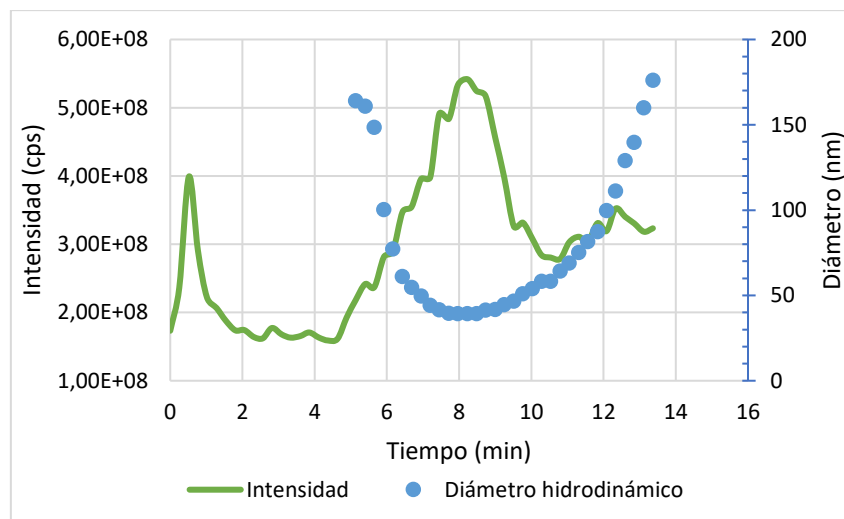


Figura 11. Representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo para el estándar de nanopartículas de Ag de 20 nm (20mg/L).

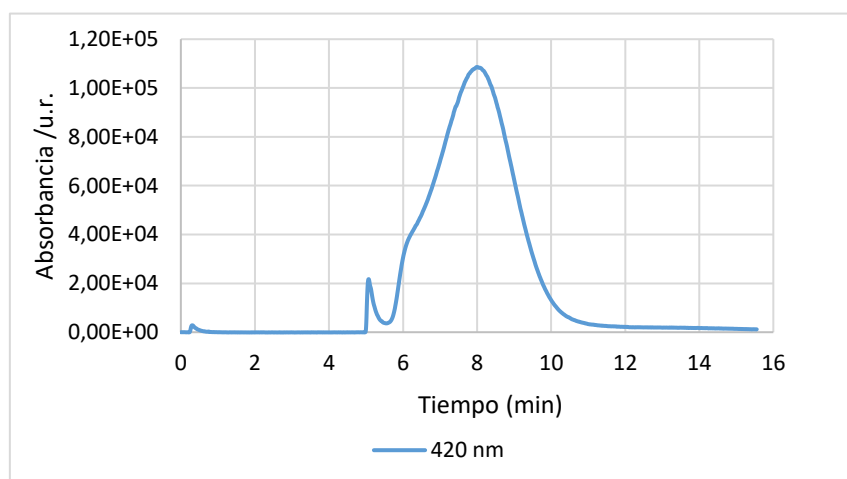


Figura 12. Fractograma del estándar de nanopartículas de Ag de 20 nm (20mg/L).

La modificación del tiempo de adquisición ha permitido la obtención de valores más próximos al esperado ($42 \pm 3,4$ nm), lo que supone una cierta mejora respecto al uso de 3 s, aunque siguen sin ser correctos, estando alejados del obtenido mediante DLS y más aún respecto al valor nominal.

4.3.2 Estudio de las condiciones instrumentales de la técnica AF4

4.3.2.1 Estudio de la influencia del caudal de salida Flow Rate

Se modifica el caudal del Flow Rate de 1 ml/min a 0.5 ml/min para ver si la estimación del tamaño de las nanopartículas de 20 nm mejora. Al modificar el flujo a la salida disminuyéndolo, los tiempos de

elución para los analitos aumentan (en un factor de 1,8 de acuerdo con la Ecuación 5), por lo que aumentan los tiempos de retención y la anchura de los mismos (en un factor de 1,33 de acuerdo con la Ecuación 6), lo que permite un aumento de los tiempos de estancia en la celda, tal y como se ha comentado anteriormente.

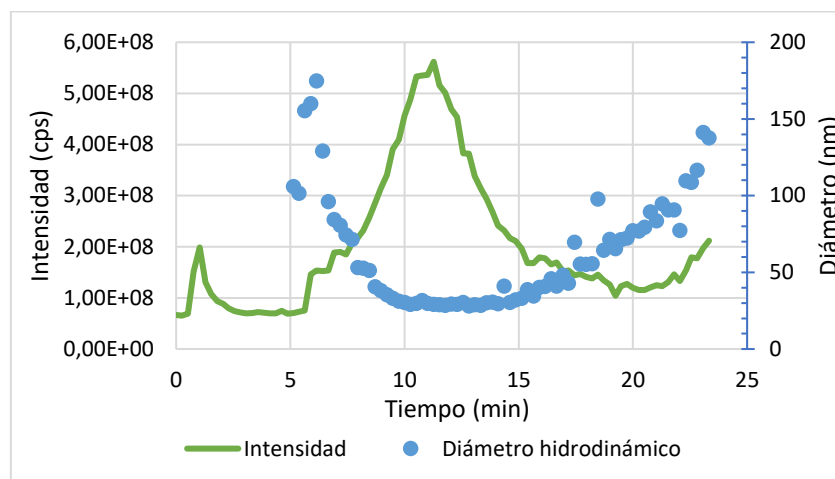


Figura 13. Representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo para el estándar de nanopartículas de Ag de 20 nm (20mg/L).

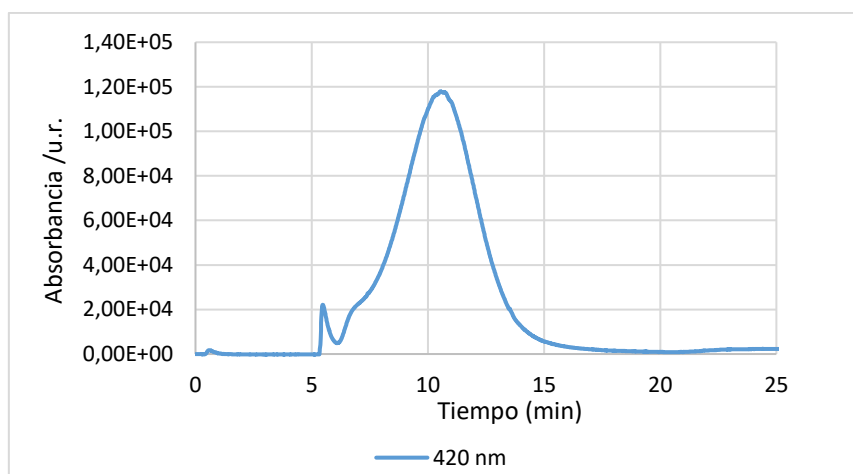


Figura 14. Fractograma del estándar de nanopartículas de Ag de 20 nm (20mg/L).

Como puede observarse en la figura 13, la estimación del tamaño de las nanopartículas ha mejorado ligeramente, con diámetros del orden de 30 nm, y próximos al obtenido mediante DLS en discontinuo.

4.3.2.2 Estudio de la influencia del caudal Cross Flow

Por último, se modifica el caudal Cross Flow, de 0.325 ml/min a 0.163 ml/min, de forma que el cociente V_c/V_{out} tenga el mismo valor que al trabajar a 1 ml/min de caudal y 0,325 ml/min de flujo cruzado, y se

mantengan los tiempos de retención (de acuerdo con la Ecuación 5), aunque con unas anchuras mayores (factor de 2 de acuerdo con la Ecuación 6), lo que permite seguir aumentando los tiempos de estancia en la celda.

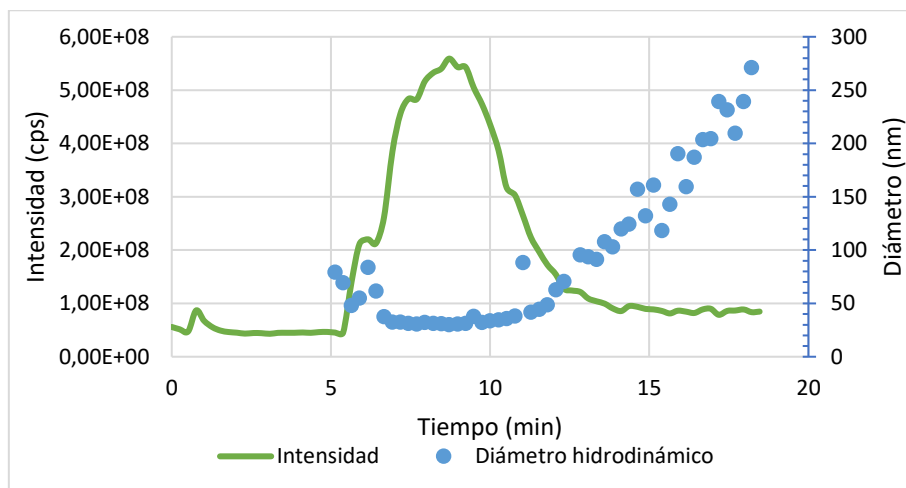


Figura 15. Representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo para el estándar de nanopartículas de Ag de 20 nm (20mg/L).

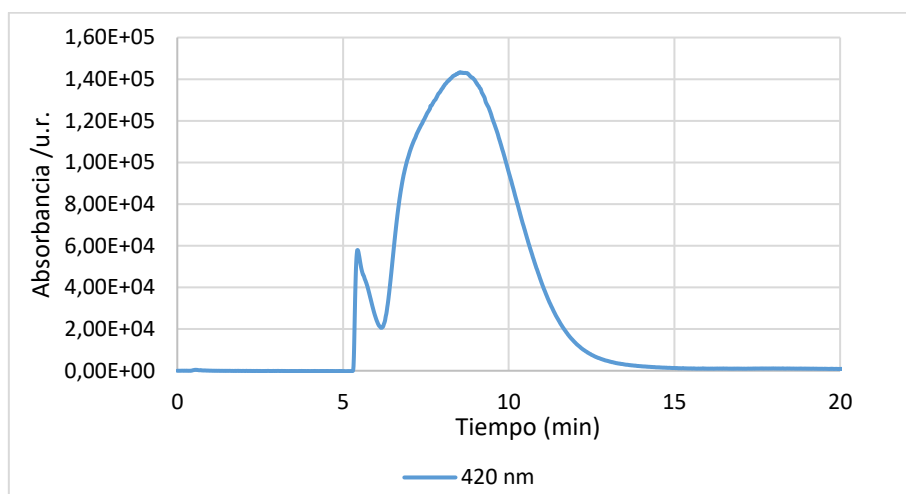


Figura 16. Fractograma del estándar de nanopartículas de Ag de 20 nm (20mg/L).

Se observa en la figura 15 que los diámetros obtenidos son del orden de 30 nm.

En la tabla 5 se comparan los diámetros, errores relativos, intensidades y tiempos de retención, obtenidos durante la modificación de las condiciones tanto de caudales en AF4 como de tiempos de adquisición estudiados en el DLS como detector en línea.

	Flow Rate (ml/min)	Cross Flow (ml/min)	Tiempo de retención (min)	Diámetro obtenido(nm)	Error relativo %
0.	1	0.325	8.21	68 ± 4.1	+240 ± 21
1.	1	0.325	8.23	42 ± 3.4	+110 ± 17
2.	0.5	0.325	11.28	31 ± 2.7	55 ± 16
3.	0.5	0.163	8.72	32 ± 1.9	60 ± 9.5

Tabla 5. Resultados de los diámetros obtenidos y errores calculados para las condiciones óptimas para Ag 20nm (20 mg/L) representados como: valor medio \pm desviación estándar $\frac{t*s}{\sqrt{N}}$ (N=10). Tiempo de adquisición en DLS: 15 s (Experimentos 1, 2 y 3); 3s (Experimento 0).

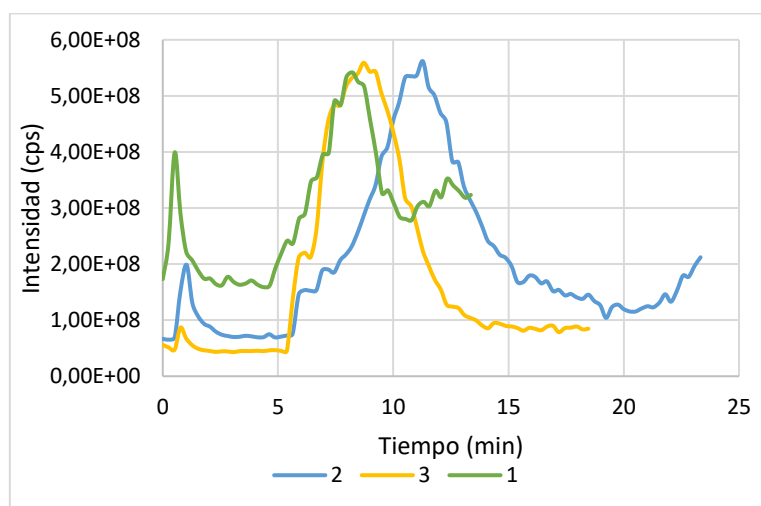


Figura 17. Comparación de las intensidades frente al tiempo para las diferentes condiciones de Cross Flow y Flow Rate.

Tal y como se observa, los diámetros obtenidos en las condiciones 2 y 3 son similares al obtenido mediante DLS en discontinuo, por lo que podemos considerar que ambas condiciones permiten obtener resultados comparables a dicho sistema. Se aplica un Test t para comprobar si los resultados del experimento 3 difieren significativamente del diámetro hidrodinámico, es decir de los resultados obtenidos en DLS, y se obtiene que los métodos no son significativamente diferentes como podría esperarse. El Test t se encuentra en los *Anexos* en el apartado 7.2, *Tabla 1*. Por tanto, se considera que las condiciones del Experimento 3 son las óptimas, al ser los resultados comparables y obtener tiempos de retención inferiores a los del Experimento 2.

4.4 Estudio del efecto de la naturaleza de distintas nanopartículas sobre la estimación de tamaño mediante AF4-DLS

Una vez estudiadas las condiciones óptimas de trabajo para las nanopartículas de plata, se va a comprobar que las señales de dispersión son independientes de la naturaleza de las especies estudiadas y que no afecta a las condiciones obtenidas, pudiendo trabajar siempre con las mismas. Para este estudio, el portador utilizado es Novachem Surfactant al 0.05 % (m/v) y las nanopartículas utilizadas son de oro y de poliestireno.

4.4.1 Nanopartículas de Au

Para el estudio de las nanopartículas de Au se eligen dos tamaños, 20 nm puesto que se estimaban de forma aproximada por DLS, pero no por AF4-DLS en las nanopartículas de Ag, y 50 nm ya que tienen un tamaño del orden de las que se estimaron correctamente en el caso de las nanopartículas de Ag.

Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla:

	<i>Diámetro obtenido (nm)</i>	<i>Error relativo %</i>
<i>Au 20 nm (20 mg/l)</i>	36 ± 3.1	$+ 80 \pm 16$
<i>Au 50 nm (20 mg/l)</i>	59 ± 1.1	$+ 18 \pm 2.2$

Tabla 6. Resultados de los diámetros obtenidos y errores calculados para las nanopartículas de Au representados como: valor medio \pm desviación estándar (N=10).

Como se observa en la tabla 6, la estimación de las nanopartículas de Au de 20 nm tiene un gran error relativo, de forma similar a lo obtenido con las de Ag.

En el caso de las nanopartículas de 50 nm, la estimación es mejor, con un error relativo del orden del 20%, valor asumible para este tipo de determinaciones de tamaño. En este caso, al no tener recubrimiento, el diámetro obtenido coincide con el nominal, a diferencia de lo que sucedía con las de 50 nm de Ag con recubrimiento de PVP. Los fractogramas obtenidos se muestran en la figura 18.

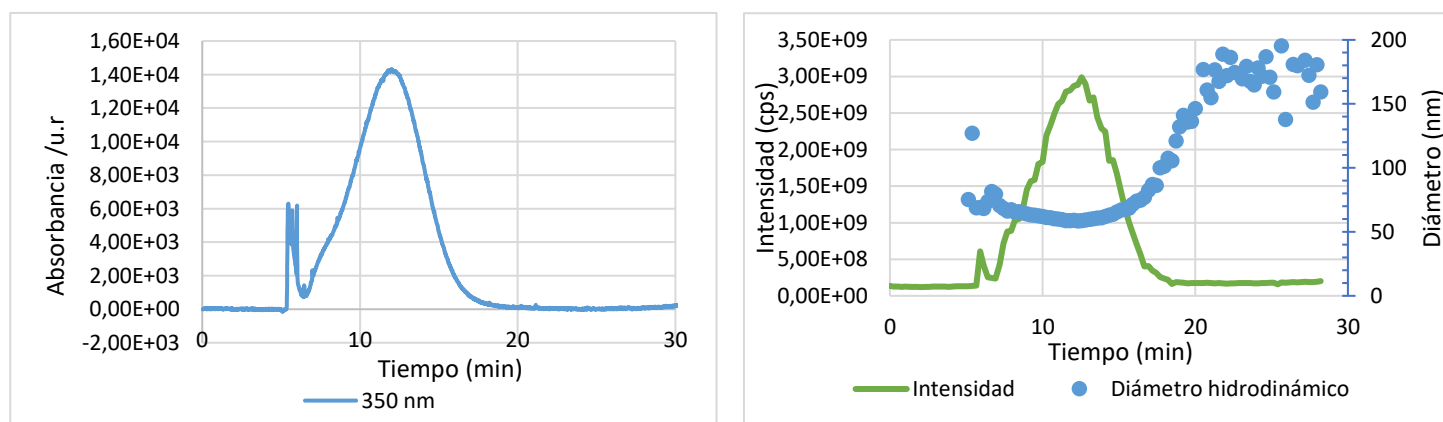


Figura 18 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para el estándar de nanopartículas de Au de 50nm (20mg/L).

Los fractogramas y representaciones de intensidad y diámetro hidrodinámico frente al tiempo para el estándar de nanopartículas de Au de 20 nm se encuentran en los *Anexos* en el apartado 7.3, *Figura 6*.

4.4.2 Nanopartículas de Poliestireno

Para el estudio de las nanopartículas de poliestireno se disponía de estándares de tres tamaños: 50 nm, 200 nm y 500 nm, todas ellas por encima del tamaño establecido como límite para la determinación mediante AF4-DLS. Este estudio permitió además comprobar si tamaños por encima de 100 nm se determinaban de forma correcta en las condiciones seleccionadas como óptimas.

Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla:

	<i>Diámetro obtenido (nm)</i>	<i>Error relativo %</i>
<i>Poliestireno 50 nm (100mg/L)</i>	58 ± 1.6	+ 16 ± 3.2
<i>Poliestireno 50 nm (50mg/L)</i>	59 ± 2.1	+ 18 ± 4.2
<i>Poliestireno 200 nm (100mg/L)</i>	164 ± 3.88	- 18 ± 1.9
<i>Poliestireno 500 nm (50mg/L)</i>	535 ± 11.1	+ 7.0 ± 2.2

Tabla 7. Resultados de los diámetros obtenidos y errores calculados para las nanopartículas de Poliestireno representados como: valor medio ± desviación estándar (N=10).

Como puede verse en la tabla 7, la estimación del tamaño para las nanopartículas de poliestireno es buena para todos los tamaños de nanopartículas, con errores relativos inferiores al 20% en todos los casos. En las figuras 19 (a) y 20 (a) se muestran los fractogramas obtenidos para las nanopartículas de 50 y 500 nm respectivamente. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos con el resto de las nanopartículas estudiadas y asegura la aplicabilidad de las condiciones óptimas seleccionadas en un rango amplio de tamaños (50 a 500 nm).

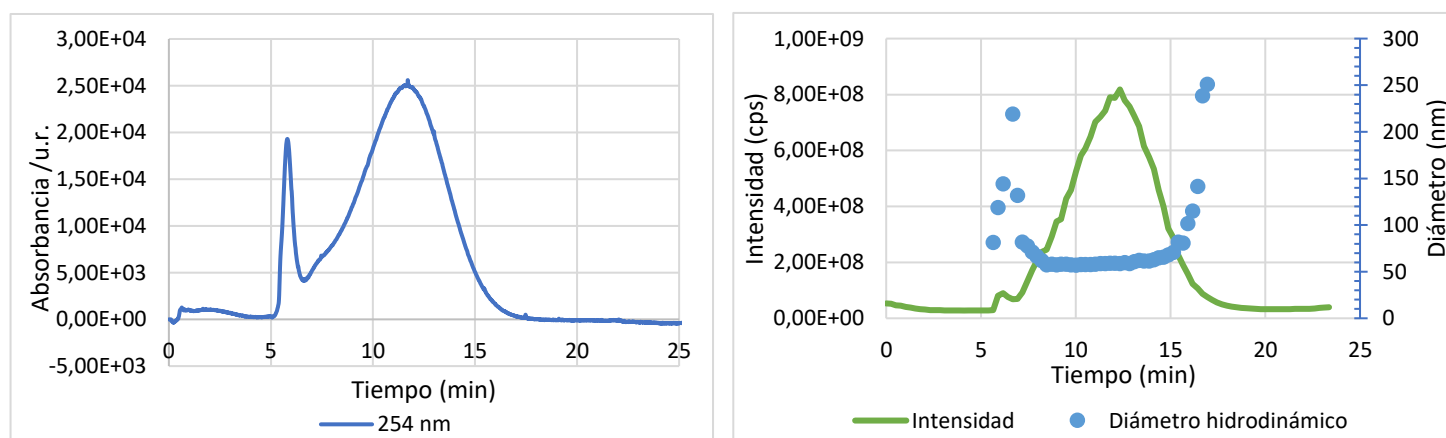


Figura 19 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para el estándar de nanopartículas de Poliestireno de 50nm (50mg/L).

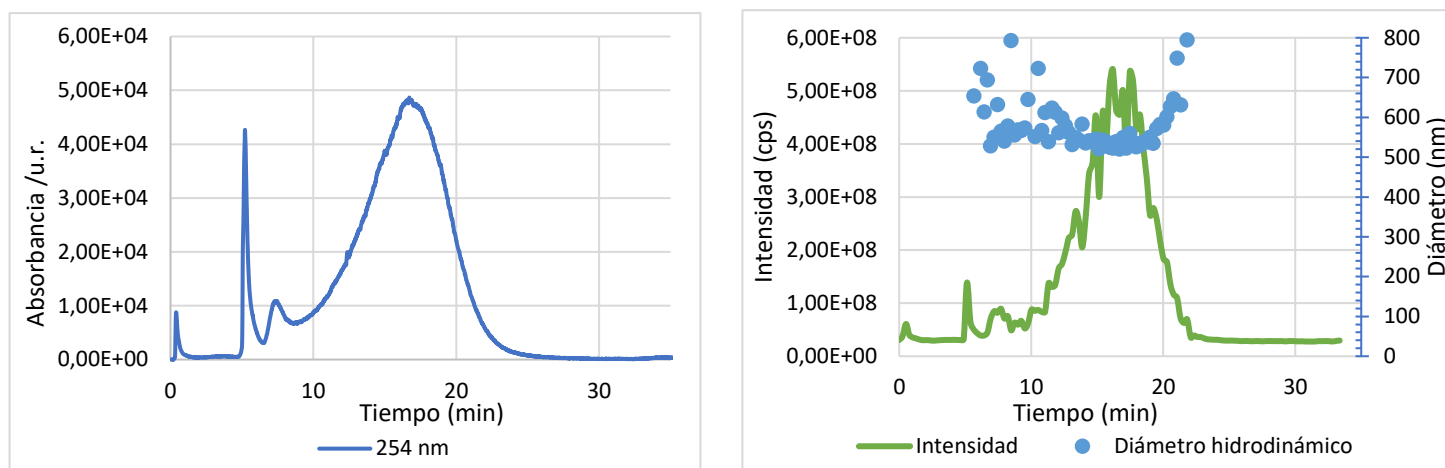


Figura 20 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para el estándar de nanopartículas de Poliestireno de 500 nm (50mg/L).

Los fractogramas y representaciones de intensidad y diámetro hidrodinámico frente al tiempo para los estándares de nanopartículas de Poliestireno de 50 y 200 nm (100 mg/L) se encuentran en los Anexos en el apartado 7.3, figuras 4 y 5.

4.5 Aplicación de AF4-DLS sobre la caracterización de nanopartículas de poliestireno en muestras cosméticas

La metodología desarrollada en el trabajo se aplicó a la caracterización de nanopartículas de plástico (polietileno) presentes en una muestra cosmética, una crema exfoliante.

En la figura 21 se muestra la distribución de tamaños obtenida mediante DLS en discontinuo. En ella se observan varias distribuciones con tamaños entre los 40 y los 200 nm (Diámetro medio: 173,9 nm). Si atendemos a los valores de polidispersidad dados por el equipo (Polidispersidad: 0.251), se obtienen resultados muy elevados, lo que reduce la fiabilidad de los mismos. Esto es debido probablemente a la complejidad de la muestra por lo que se propone el estudio con AF4-DLS para aislar cada uno de los posibles componentes presentes en la muestra mediante AF4 y, estudiar su tamaño mediante DLS y comprobar si los resultados mejoran.

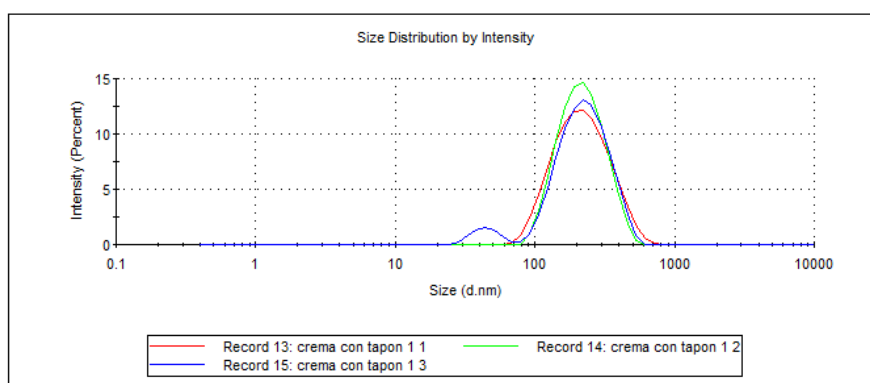


Figura 21. Resultados obtenidos en DLS para la muestra cosmética (3 repeticiones).

En este caso las condiciones empleadas para las medidas son:

- Caudal: 0.5 ml/min.
- Flujo cruzado: 0.1 ml/min.
- Tiempo de adquisición en DLS: 15 s.
- Composición del portador: Novachem Surfactant al 0.05 % (m/v).

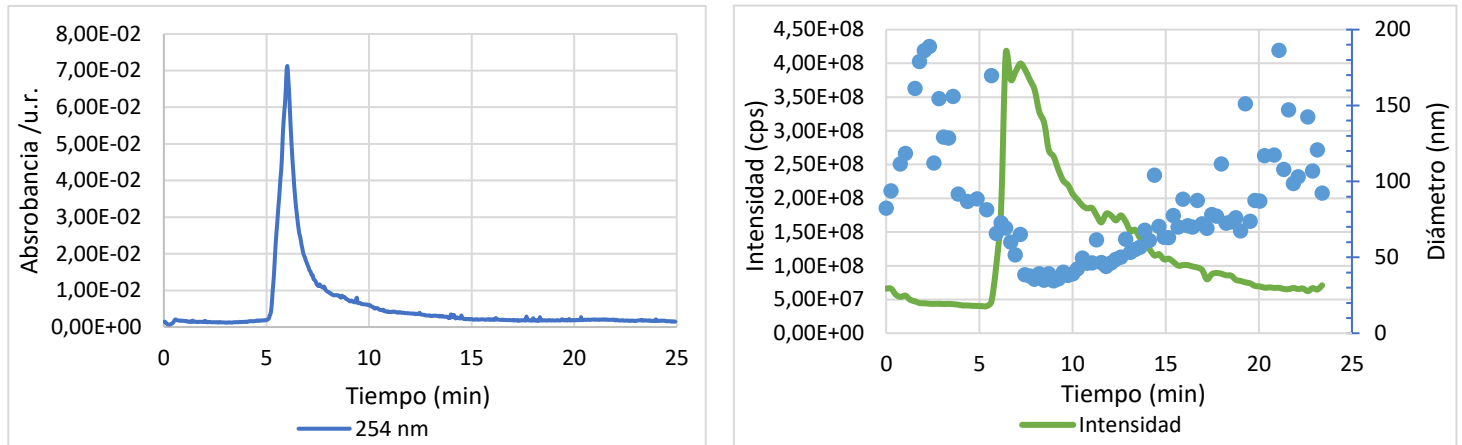


Figura 22 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para la muestra cosmética.

Como se observa en la Figura 22 (b), la muestra cosmética tendría mayoritariamente nanopartículas de plástico (polietileno) de un tamaño en torno a 35 nm, de acuerdo con la señal de absorbancia a 254 nm y los diámetros correspondientes a esos tiempos en DLS, así como una población en menor proporción con tamaños comprendidos entre los 50 y los 150 nm, aunque la dispersión de los valores de diámetros en esta zona del fractograma hacen difícil su asignación.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este Trabajo Fin de Grado pueden resumirse en:

El acoplamiento de técnicas de separación como AF4 a técnicas de dispersión de radiación exige el estudio de las variables que afectan fundamentalmente al tiempo de residencia de las especies objeto de estudio en la celda de medida, mejorándose los resultados al aumentar dicho tiempo. En el presente trabajo se han estudiado el caudal del portador y el flujo cruzado aplicado en AF4 a modo de ejemplo.

El aumento del tiempo de adquisición de la señal de radiación dispersada en DLS permite un mejor ajuste de la función de correlación y unas estimaciones de tamaño más próximas a los valores esperados. Sin embargo, dicho aumento es a costa de perder número de medidas en las señales transitorias obtenidas mediante AF4. Tiempos de 15 s son adecuados para las señales típicas obtenidas en AF4, del orden de 4-6 min de anchura.

En cualquier caso, es recomendable trabajar con nanopartículas con tamaños por encima de los 40 nm y concentraciones del orden de los 10-20 mg/L para obtener resultados fiables. La naturaleza de las nanopartículas no tiene influencia práctica en los tamaños estimados.

En muestras que contienen nanopartículas, el uso de AF4-DLS puede mejorar los resultados obtenidos en DLS debido a que es capaz de obtener información de los componentes individuales, aunque el uso de técnicas complementarias, como la microscopía electrónica, puede ser necesario para una mejor caracterización.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Baalousha, M. Stolpe, B. Lead, J.R. Flow field – flow fractionation for the analysis and the characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, 4078-4103.
2. Bendixen, N., Losert, S., Adlhart, C., Lattuada, M., Ulrich, A. Membrane particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Chromatography A*. **2014**, 1334, 92-100.
3. Kihyun, Kim., Seungho, Lee., Woonjungl, Kim. Characterization of carbon black nanoparticles using asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFFFF). *Analytical Science & Technology*. **2019**, Vol. 32 No. 3, 77-87.
4. Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, María T. Jiménez, María S., Perez-Arantegui, J., Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*. **2016**, 10-32.
5. De la Calle, I., Menta, M., Klein, M., Maxit, B., Séby, F. Towards routine analysis of TiO₂ (nano-)particle size consumer products: Evaluation of potential techniques. *Spectrochimica Acta Part B*. **2018**, 147, 28-42.
6. Vezocnik, V., Rebolj, K., Sitar, S., Ota, K., Tusek-Znidaric, M., Strus, J., Sepcic, K., Pahovnik, D., Macek, P., Zagar, E. Size fractionation and size characterization of nanoemulsions of lipid droplets and large unilamellar lipid vesicles by asymmetric-flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering and dynamic light scattering. *Journal of Chromatography A*. **2015**, 1418, 185-191.
7. Maguire, C. M., Rösslein, M., Wick, P., Prina-Mello, A. Characterisation of particles in solution – a perspective on light scattering and comparative technologies. *Science and Technology of Advanced Materials*. **2018**, 19:1, 732-745.

8. Moens, C., Waegeneers, N., Fritzsche, A., Nobels, P., Smolders, E. A systematic evaluation of Flow Field Flow Fractionation and single-particle ICP-MS to obtain the size distribution of organo-mineral iron oxyhydroxide colloids. *Journal of Chromatography A*. **2019**, 1599, 203-214.
9. Gomez-gonzalez, M., Voegelin, A., Garcia-Guinea, J., Bolea, E., Laborda, F., Garrido, F. Colloidal mobilization of arsenic from mining-affected soils by surface runoff. *Chemosphere*. **2016**, 144, 1123-1131.
10. Von der Kammer, F., Legros, S., Larsen, E.H., Loeschner, K., Hofmann T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **2011**, Vol. 30 No.3, 425-436.
11. Cruz, D., Rodriguez, M., López, J., Herrera, V., Orive, A., Creus, A. Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. **2012**, Vol. 3 No.2, 67-78.
12. Jarzebski, M., Bellich, B., Bialopiotrowicz, T., Sliwa, T., Kosciński, J., Cesàro, A. Particle tracking análisis in food and hydrocolloids investigations. *Food Hydrocolloids*. **2017**, 68, 90-101.
13. Amde, M. Tan, Z. Liu, J. Separation and size characterization of zinc oxide nanoparticles in environmental waters using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Talanta*. **2019**, 200, 357-365.
14. Cho, T.J., Hackley, V.A. Fractionation and characterization of gold nanoparticles in aqueous solution: asymmetric-flow field flow fractionation with MALS, DLS, and UV-Vis detection. *Anal Bioanal Chem*. **2010**, 398, 2003-2018.
15. Caputo, F., Arnould, A., Bacia, M., Ling, W.L., Rustique, E., Texier, I., Melo, A.P., Couffin, A. Measuring Particle Size Distribution by Asymmetric Flow Field Flow Fractionation: A Powerful Method for the Preclinical Characterization of Lipid-Based Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics*. **2019**, 16, 756-767.
16. Rashid N. Qureshi and Wim Th. Kok. *Optimization of Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation (AF4)*. Polymer-Analysis Group, van't Hoff Institute for Molecular Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. LCGC Europe. **2010**, Vol. 23, Issue 1, 18-25.

7. ANEXOS

7.1 Estudio del efecto del tamaño de las nanopartículas sobre la estimación del tamaño mediante AF4 – DLS

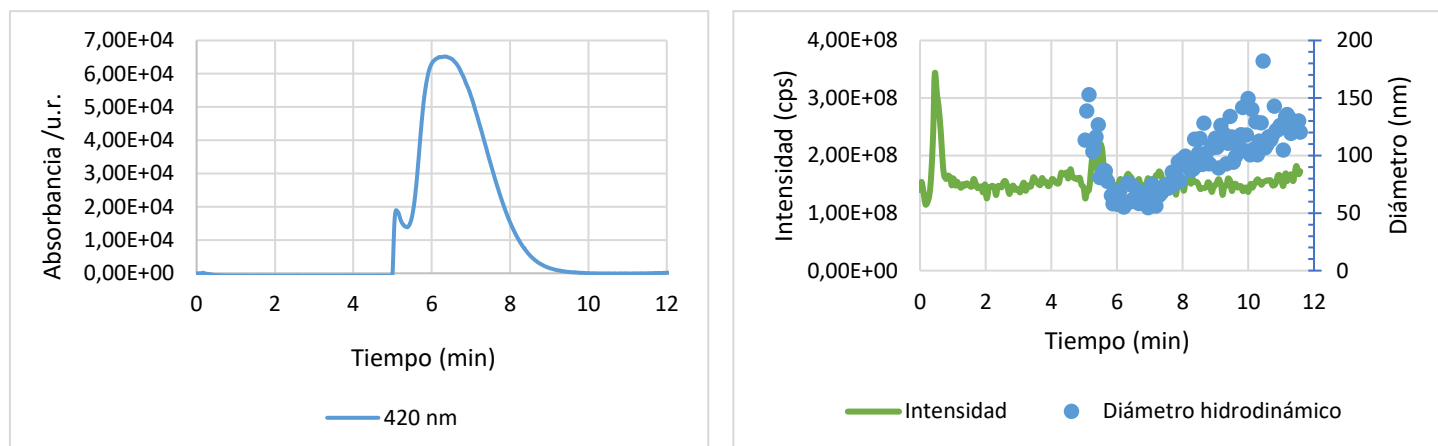


Figura 1 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para los estándares de nanopartículas de Ag de 10 nm (20mg/L).

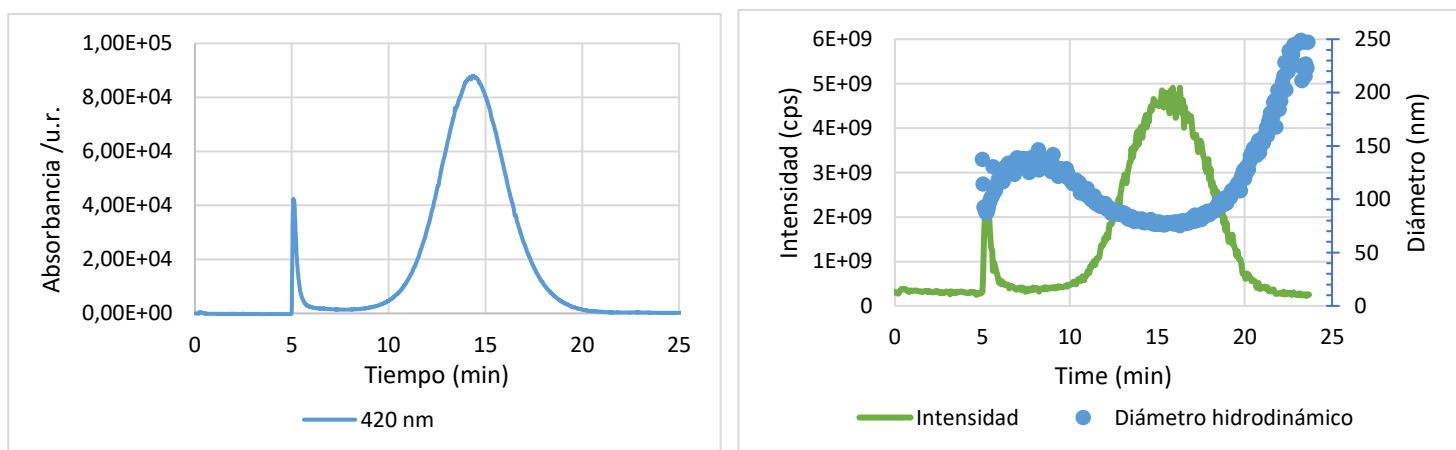


Figura 2 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para los estándares de nanopartículas de Ag de 50 nm (20mg/L).

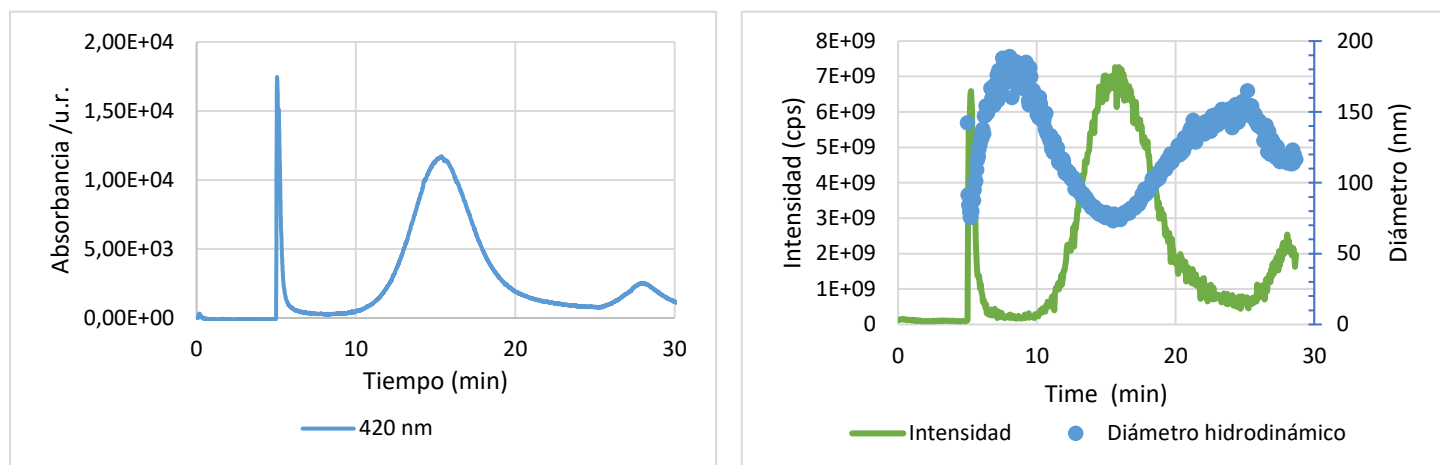


Figura 3 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para los estándares de nanopartículas de Ag de 100 nm (20mg/L).

7.2 Estudio de los parámetros instrumentales óptimos para el estudio de condiciones límite

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Variable 1	Variable 2
Media	31.4666667	31.8955554
Varianza	37.2024333	3.41820437
Observaciones	3	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-0.12014759	
P(T<=t) una cola	0.45767389	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.91534777	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

Tabla 1. Test t comparando Experimento 3 y resultados DLS.

7.3 Estudio del efecto de la naturaleza de distintas nanopartículas sobre la estimación de tamaño mediante AF4-DLS

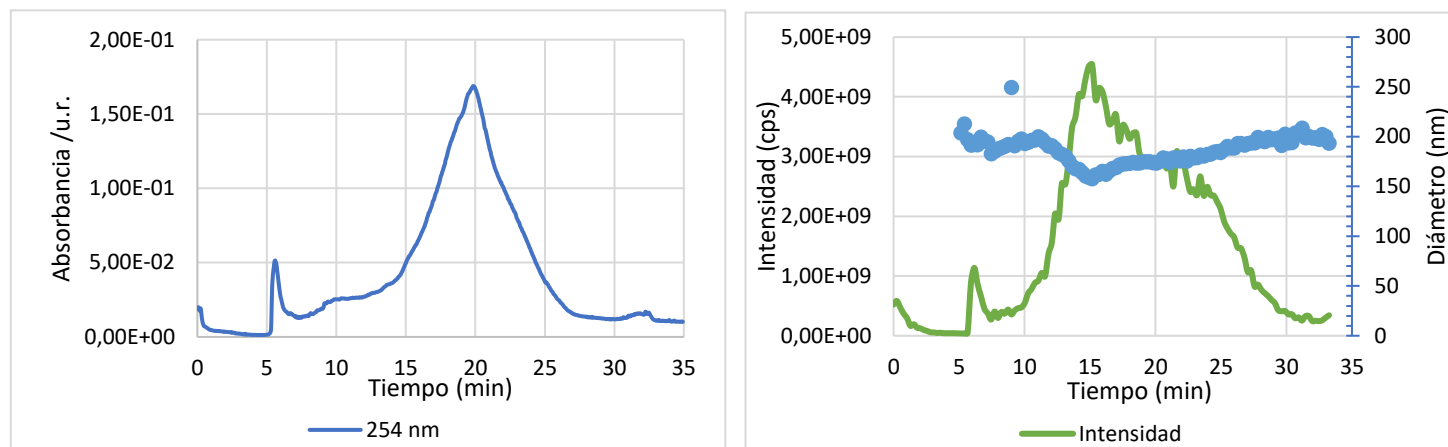


Figura 4 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para los estándares de nanopartículas de Poliestireno de 200 nm (100mg/L).

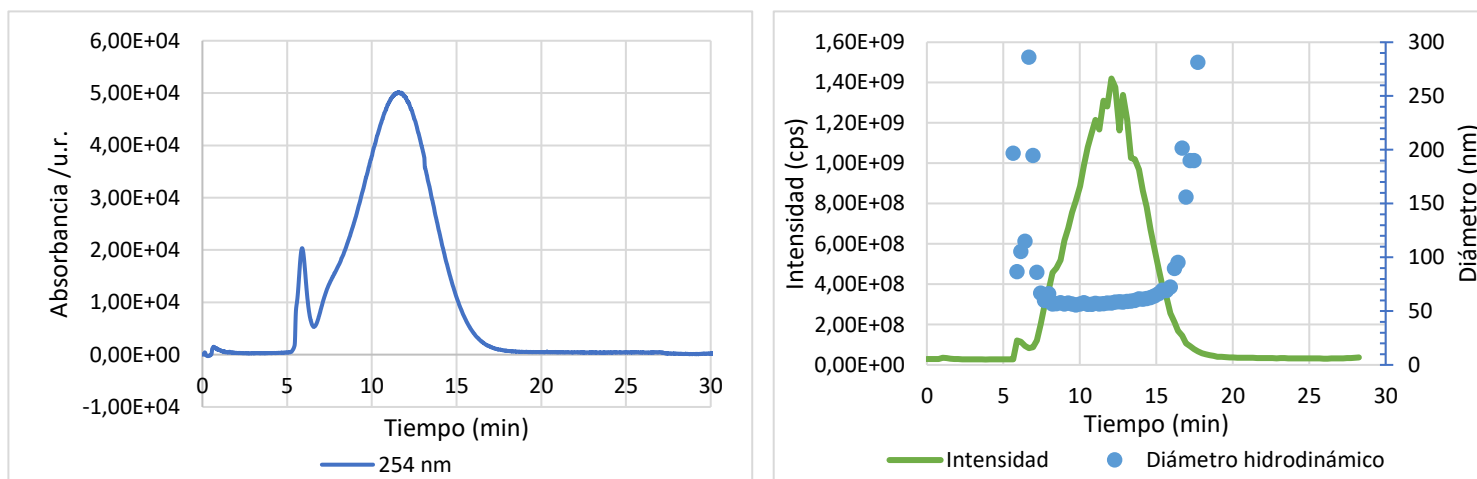


Figura 5 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para los estándares de nanopartículas de Poliestireno de 50 nm (100mg/L).

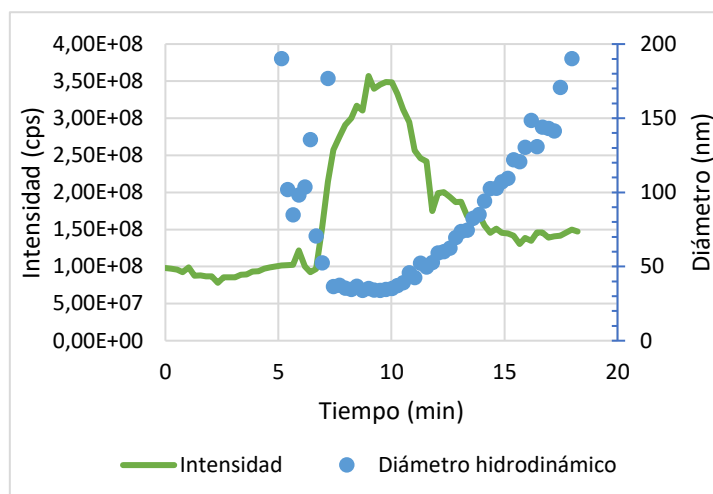
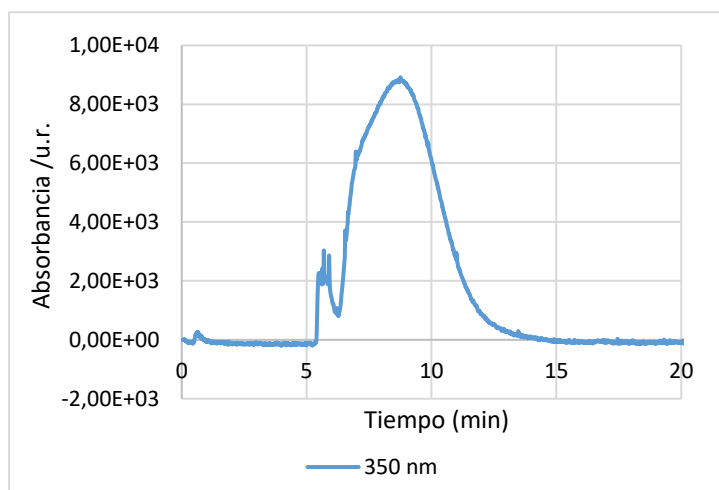


Figura 6 (a y b). Fractograma (a) y representación de la intensidad y del diámetro hidrodinámico frente al tiempo (b) para el estándar de nanopartículas de Au de 20nm (20mg/L).